

09/069,847

PATENT OFFICE OF JAPAN
OFFICIAL GAZETTE FOR EXAMINED PATENTS (B2)

#1
IDS
Attack

(11) Japanese Kokoku Patent Publication No. Hei 5-15439

(24)(44) Publication Date: March 1, 1993

(51) Int. Cl.

C 12 Q 1/68

G 01 N 33/50

33/52

ID No.

A

P

C

Intraoffice No. FI

8114-4B

7055-2J

7055-2J

Number of Inventions: 1

(Total of 5 pages)

(21) Application No.: Sho 59-123757

(22) Application Date: June 18, 1984

(42) Kokai No.: Sho 61-3063

(43) Kokai Date: January 9, 1986

(72) Inventor

Yoshihiro Ashiara
c/o Fujirebio Inc.
4-6-7 Shimo-Ochiai
Shinjuku-ku, Tokyo-to

(72) Inventor

Yasushi Kasahara
c/o Fujirebio Inc.
4-6-7 Shimo-Ochiai
Shinjuku-ku, Tokyo-to

(71) Applicant:

Fujirebio Inc.
2-7-1 Nishi-Shinjuku
Shinjuku-ku, Tokyo-to

(74) Agent:

... [illegible] Tsukuni, patent attorney (and two others)

Examiner

Eriko Suzuki

(55) Reference:

Japanese Patent Application Sho 58-23795 (JP, A)

(54) Title of Invention

Method for Measuring Polynucleotides Using Luminescent Substances

(57) Claims

1. A method for measuring polynucleotides characterized by contacting the single-stranded polynucleotide being measured with a labeled polynucleotide, which is a single-stranded polynucleotide that can form a double-stranded polynucleotide with the single-stranded polynucleotide that is the object of measurement and to which luminescent substance 1 is bonded directly or indirectly and to which luminescent substance 2, which emits light on being excited by luminescent substance 1, is also bonded, to form a double-stranded polynucleotide;

allowing a double-stranded polynucleotide restriction enzyme to act on this double-stranded polynucleotide and cut it; and measuring the luminescence of luminescent substance 1 or 2.

2. The measurement method of Claim 1 wherein luminescent substance 2 is a fluorescent substance.

Detailed Explanation of the Invention

Object of the Invention

Industrial field of use

The measurement of deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA), which have specific structures, is important in the field of biochemistry. For example, tests for viral infections or the discovery of a genetic disease can be carried out by measuring the DNA in human blood serum. The present invention provides a method for measuring the specific structures of such DNA and RNA easily and accurately.

Prior art and problems that this invention will solve

In the past, the following method was used to measure this DNA or RNA. Single-stranded DNA (S-DNA) or single-stranded RNA (S-RNA) obtained by denaturing the specimen was bonded to a solid phase. Then S-DNA or S-RNA labeled with radioisotopes was allowed to act on this solid phase to form a hybrid with the S-DNA or S-RNA of the solid phase. Then the unreacted labeled S-DNA or S-RNA was removed, and the radiation of the solid phase was measured. This method required numerous processes such as fixation and washing when measuring, and fixation of the sample in particular took a long time, so there were problems in both the labor and time required by the operations.

Recently, however, a technique for measuring polynucleotides by cutting the DNA probe short bonding a fluorescent substance that transfers energy at the 5'- and 3'-positions of that, causing energy transfer by the hybrid, and measuring fluorescence by that has been developed (Japanese Patent Kokai Publication Sho 58-40099). However, the problems of this method were that the probe was cut short, so its specificity declined, and there was also little fluorescence, so sensitivity was not sufficient.

As a result of various investigations to develop a method that was not attended by such problems, the present inventors submitted the method of bonding a single-stranded polynucleotide labeled in advance to a solid phase, allowing a single-stranded polynucleotide obtained by denaturing the sample to act on this solid phase and form a hybrid, and cutting the hybrid polynucleotide with a restriction enzyme, and they have already applied for a patent on this (Japanese Patent Application Sho 58-199702). However, this method still required separation of

a solid phase, and especially in clinical analyses that treated a large quantity of specimens at one time, this separation operation was complicated.

Constitution of the invention

The present invention solves such problems by bonding two kinds of luminescent substances to a single-stranded polynucleotide hybridized with the single-stranded polynucleotide that is being measured and utilizing the fact that the energy transfer between them changes due to cutting this polynucleotide.

Means for solving the problems

This invention relates to a method for measuring polynucleotides characterized by contacting the single-stranded polynucleotide being measured with a labeled polynucleotide, which is a single-stranded polynucleotide that can form a double-stranded polynucleotide with the single-stranded polynucleotide being measured and to which luminescent substance 1 is bonded directly or indirectly and to which luminescent substance 2 that emits light on being excited by luminescent substance 1 is also bonded, to form a double-stranded polynucleotide; allowing a double-stranded polynucleotide restriction enzyme to act on this double-stranded polynucleotide and cut it; and measuring the luminescence of luminescent substance 1 or luminescent substance 2.

The object of measurement is a single-stranded polynucleotide (hereinafter called the polynucleotide being measured). The polynucleotides that can be measured include DNA and RNA. When the polynucleotide contained by the sample is double-stranded, it must be converted to a single strand by an alkali treatment, such as adding sodium hydroxide solution, or by heat treatment. The kind of sample does not matter, but is, for example, human blood serum, urine, tissue extract, or the like. When there is concern that the polynucleotide is bound to a protein, as in the case of human blood serum, the sample should be treated with protease, etc., to separate the protein.

The single-stranded polynucleotide that is contacted with this polynucleotide being measured (hereinafter called the labeled polynucleotide) is one with luminescent substance 1 bonded to it directly or indirectly and luminescent substance 2 that emits light upon being excited by luminescent substance 1 also bonded to it, and it can form a double-stranded polynucleotide with the polynucleotide being measured. Consequently, this labeled double-stranded polynucleotide is a probe for the polynucleotide being measured. This labeled polynucleotide may be obtained by denaturing a double-stranded polynucleotide that contains the polynucleotide being measured by alkali or heat treatment, or it may be obtained by successively bonding each

nucleotide in the presence of the polynucleotide being measured, DNase I, and DNA polymerase

Luminescent substance 1 may be a fluorescent or phosphorescent substance that absorbs light from the outside and emits light, or it may be a chemiluminescent or bioluminescent substance that emits light by a chemical reaction such as oxidation.

Luminescent substance 2 emits light upon being excited by luminescent substance 1. Consequently, it is a fluorescent substance or a phosphorescent substance.

The fluorescent substances that can be used for luminescent substance 1 and luminescent substance 2 usually emit light when excited by a wavelength of about 320-600 nm. As examples of such fluorescent substances, fluorescein, rhodamine, dansyl chloride, fluorescamine, coumarin, acridine, NADPH, NADH, benzoxadiazole, triarylmethane, pyrines, and derivatives and activated forms of these can be mentioned.

As examples of chemiluminescent substances that can be used for luminescent substance 1, luminol, isoluminol, acridinium, hydroperoxide, porphyrin, indol-3-ylhydroperoxide, 2,4,5-triphenylimidazole, and derivatives of these can be mentioned. As examples of bioluminescent substances, luciferin that emits light due to luciferase can be mentioned.

When a chemiluminescent or bioluminescent substance is used for luminescent substance 1, a substance that causes these luminescent substances to emit light directly or indirectly can be bonded to the labeled substance. For example, when luciferin is used for luminescent substance 1, luciferase or its substrate can be bonded and the luciferin caused to emit light by its action.

In the method of this invention, luminescent substance 2 is excited by luminescent substance 1, so a combination with such a relationship must be selected. As an example of such combinations, fluorescein and rhodamine can be mentioned. Fluorescein is excited by light of a wavelength of 430-530 nm and fluoresces light of a wavelength of 500-560 nm. On the other hand, rhodamine is excited by light of a wavelength of 530-580 nm and fluoresces light of a wavelength of 560-620 nm. Consequently, if a mixture of these is exposed to light of a wavelength of 430-530 nm, fluorescence of 560-620 nm is seen in addition to fluorescence of 500-560 nm.

The method used to bond luminescent substance 1 to the labeled polynucleotide directly, or indirectly by means of biotin-avidin [sic; avidin?] and the method used to bond luminescent substance 2 to the labeled polynucleotide may be the known methods of preparing labeled DNA. For example, one need only introduce the luminescent substances into a mononucleotide to give

a modified nucleotide, then mix an unmodified mononucleotide in this, and convert these to a polynucleotide by the nick translation method or by the method of chemical synthesis of polynucleotides. In addition, one may produce a polynucleotide by nick translation or by cDNA preparation with *E. coli*, activation of the luminescent substances, and react its active group with the polynucleotide. As methods of bonding the luminescent substances, not only the method of directly bonding them to the polynucleotide, but also indirect methods such as bonding the biotin or biotin-avidin to the polynucleotide, bonding avidin to the luminescent substance, and bonding these utilizing the reaction of this biotin and avidin may be adopted.

The method of this invention is characterized by causing transfer of energy from luminescent substance 1 to luminescent substance 2. In order to cause efficient energy transfer, it is preferred to bond luminescent substance 1 and luminescent substance 2 to the polynucleotide so that the space between the two is no more than 50 Å, and therefore within 24-26 bases.

Contacting such a labeled polynucleotide with the polynucleotide being measured causes a double-stranded polynucleotide to form. The contact time will usually be enough so that the polynucleotide being measured can react sufficiently with the labeled polynucleotide and form a hybrid. For example, about 0.5-40 hours is suitable. The temperature should be about 20-70°C and the pH about 5-9.

After formation of the double-stranded polynucleotide, a double-stranded polynucleotide restriction enzyme (hereinafter simply referred to as the restriction enzyme) is allowed to act on this. This restriction enzyme should act specifically on the double-stranded polynucleotide alone. Also, one whose recognition polynucleotide chain is not too long is preferred. One kind of restriction enzyme may be used alone, or two or more kinds may be used together. The time when the restriction enzyme is allowed to act is usually after the conclusion of the reaction between the polynucleotide being measured and the labeled polynucleotide, but in some cases it may be added to the reaction system at the same time as the polynucleotide being measured or before that.

After the restriction enzyme has been allowed to act, the luminescence of luminescent substance 1 or luminescent substance 2 is measured. One need only measure its intensity using an ordinary fluorescence photometer.

Action

The labeled polynucleotide forms a hybrid with the polynucleotide being measured. Due to the formation of this hybrid, the restriction enzyme acts, cutting this double-stranded polynucleotide. As a result, the luminescent substance 1 and luminescent substance 2 bonded to the polynucleotide being measured are divided and move about in the solution separately, so energy

transfer no longer occurs. Hence, the luminescence intensity of luminescent substance 1 no longer decreases, while luminescent substance 2 no longer emits light.

Effects of the invention

The method of this invention utilizes the energy transfer from luminescent substance 1 to luminescent substance 2, and since the luminescence wavelength of luminescent substance 1 differs from that of luminescent substance 2, the luminescence of the two can be quantified separately. As a result, unlike the method of the previous application, separation of solid and liquid phases and also the washing operation which attends that are unnecessary.

The method of this invention, unlike the methods of the prior art, entails no complicated operation of fixing the polynucleotide being measured to a solid phase. Even compared with the method of the previous application, it has been further simplified in that a solid-liquid separation operation is unnecessary. The reagents and equipment used in the method of this invention are easy to assemble as a kit, and polynucleotides such as DNA can be measured practically and simply using this kit.

Practical examples

(1) Preparation of HBV-DNA probe

Pooled serum (500 mL) of chronic hepatitis B patients was centrifuged at 9,000 rpm for 15 min, the supernatant obtained was centrifuged at 4°C and 100,000 x g for five hours, and the hepatitis B virus (HBV) was collected as a pellet. This pellet was dissolved in 10 mL of a 0.01 M TRIS-hydrochloric acid buffer (pH 7.5) containing 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, and 0.1% BSA. Five milliliters of this virus solution was stored, and the remaining 5 mL was again centrifuged at 100,000 x g for five hours to obtain a pellet.

This pellet was treated with 200 μ L of a solution (pH 7.5) of 10 mM TRIS-hydrochloric acid and 0.1 M NaCl containing 0.5% NP-40 to activate the DNA polymerase. To this solution was added 50 μ L of 0.08 M MgCl₂ and 0.2 M TRIS buffer solution (pH 7.5) containing 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 2.5 μ M ³²PdGTP, and 2.5 μ M ³²PdCTP, and this was heated for three hours. This solution was superposed in a centrifuge tube containing a 30% sucrose solution and centrifuged at 50,000 rpm for three hours with a SW65 rotor (manufactured by Beckman) to obtain a pellet. This pellet was treated with Pronase, and the solution obtained was extracted twice with phenol. This extract was centrifuged at 50,000 rpm for three hours with a 5-20% sucrose gradient, the 15S ³²PDNA fraction was collected, and this was pooled. The 15S ³²PDNA was precipitated from this fraction using ethanol and dried to obtain the HBV-DNA that was the objective.

(2) Preparation of modified HBV-DNA by nick translation

Next, 1 μ g of HBV-DNA obtained in (1), 100 pg of DNase I, and 100 pg of DNA polymerase I were added to 100 μ L of 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 7.5) containing 5 mM MgCl₂, 10 mM 2-mercaptoethanol, 5 μ M dTTP, 5 μ M dGTP, 5 μ M dCTP, 5 μ M dATP, 10 μ M aminoxyethyl dATP, and 10 μ M of aminoxyethyl dCTP, and this was incubated at 15°C for 90 minutes. This solution was extracted with phenol and purified with a Sephadex G-50 column to obtain modified HBV-DNA.

Then 8 mL of formamide was added to 1 mg (1 mL) of this double-stranded HBV-DNA and 5 mg (2 mL) of single-stranded M13-phage DNA into which HBV-DNA had been introduced, and this mixed solution was boiled for five minutes. Next, 2 mL of buffer (0.07 mol/L TRIS-HCl, 2 mol/L NaCl, 1.5 mM EDTA, pH 7.5) was added to this and heated at 50°C for four hours and also at 60°C for one hour.

This reaction solution was gel filtered with Bio-Gel A50m to separate the hybrid DNA and unreacted DNA. The initial peak that eluted close to the void fraction was fractionated, and powder was added to this and dissolved so that the NaCl became 0.1 M. Then 100% ethanol (2 mL) was also added at a ratio of two times the solution (1 mL), and this was allowed to stand at -70°C for two hours. Next, this solution was centrifuged at 17,000 x g for 10 minutes, and the ethanol precipitate was dissolved with 50 mL of 0.1 N NaOH, 0.25 mM EDTA, and 0.001% phenol red. Immediately this was gel filtered with Bio-Gel A50 to obtain the single-stranded HBV-DNA that was the objective.

(3) Introduction of luminescent substances

Two milliliters of 0.1 M carbonate buffer (pH 10.0) containing 100 μ g of the single-stranded HBV-DNA obtained in (2) was mixed in 100 μ L of DMF buffer containing 1.0 μ g each of rhodamine isothiocyanate and fluorescein isothiocyanate, and this was reacted at 4°C for 8 hours. This product was gel filtered with Sephadex G-50 to obtain 100 μ g of single-stranded labeled HBV-DNA into which fluorescein and rhodamine had been introduced.

(4) Measurement of human serum HBV-DNA

Then 100 μ L of 0.5 N NaOH was added to 100 μ L of serum from a viral hepatitis B patient and stirred for 10 minutes at room temperature. Next, 100 μ L of 0.5 N HCl was added, and 200 μ L of 200 μ g/mL proteinase K solution was also added. This was reacted at 70°C for one hour. One hundred microliters of a solution containing 10 ng of single-stranded labeled HBV-DNA to which the luminescent substances fluorescein and rhodamine were bonded, prepared in paragraph (3) above, was added, and this was allowed to stand at 37°C overnight. To this 1.0 mL of d-DNA restriction enzyme solution (1 U/mL each of Bgl II, Ava II, Hae II, Hae [illeg.], Hap II,

and Hinc II, 10 mM TRIS-HCl, 7 mM MgCl₂, 70 mM NaCl, and 7 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5) was added and reacted at 37°C for one hour. The reaction product was exposed to 470-nm light, and the fluorescence intensity of 600 nm was measured.

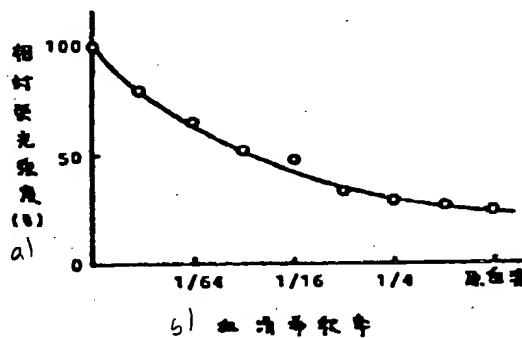
The figure shows the results obtained. The vertical axis represents relative fluorescence intensity, and the horizontal axis represents the degree of dilution of the serum.

Next, the amount of HBV-DNA in each serum measured by the method of this invention and by the method using radioisotopes of the prior art are shown.

	Method of this invention	Method of the prior art
A	100 pg	110 pg
B	ND	ND
C	210 pg	200 pg
D	890 pg	860 pg
E	60 pg	70 pg

Brief Description of the Figure

The figure shows an example of the relation between the relative fluorescence intensity of luminescent substance 2 measured by the method of this invention and the dilution ratio of the serum.



- a) Relative fluorescence intensity (%)
- b) Horizontal axis: Dilution ratio of serum

④特許公報 (B2)

平5-15439

④Int.Cl.

C 12 Q 1/68
I G 01 N 33/50
33/52

識別記号

府内整理番号

A 8114-4B
P 7055-2J
C 7055-2J

④④公告 平成5年(1993)3月1日

発明の数 1 (全5頁)

④発明の名称 発光物質を利用したポリヌクレオチドの測定方法

④特 願 昭59-123757

④公 開 昭61-3063

④出 願 昭59(1984)6月18日

④昭61(1986)1月9日

④発明者 戸 原 雄 弘 東京都新宿区下落合4丁目6番7号 富士レビオ株式会社
内④発明者 笠 原 靖 東京都新宿区下落合4丁目6番7号 富士レビオ株式会社
内

④出 願 人 富士レビオ株式会社 東京都新宿区西新宿2丁目7番1号

④代 理 人 弁理士 津 国 雄 外2名

審 查 官 鈴 木 恵 理 子

④参考文献 特開 昭58-23795 (JP, A)

1

2

④特許請求の範囲

1 測定対象の一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖ポリヌクレオチドを形成しうる一本鎖ポリヌクレオチドに、発光物質1が直接又は間接的に結合し、かつ発光物質1によって励起されて発光する発光物質2が結合している標識ポリヌクレオチドに：測定対象の一本鎖ポリヌクレオチドを接触させて二本鎖ポリヌクレオチドを形成させ；該二本鎖ポリヌクレオチドに二本鎖ポリヌクレオチド制限酵素を使用させて該二本鎖ポリヌクレオチドを切断し；その後発光物質1又は発光物質2の発光を測定することを特徴とするポリヌクレオチドの測定方法。

2 発光物質2が蛍光物質である特許請求の範囲
第1項記載の測定方法。

発明の詳細な説明

【発明の目的】

(産業上の利用分野)

特定の構造を有するデオキシリボ核酸(DNA)及びリボ核酸(RNA)の測定は生化学分野において重要であり、例えば人血清中のDNAを測定することによってウイルス感染の検査あるいは遺伝性疾患の発見などを行なうことができる。本発明はこのようなDNA及びRNAの特定のものを簡

便かつ正確に測定しうる方法を提供するものである。

(従来の技術及び発明が解決しようとする問題点)

従来、このDNA又はRNAの測定方法としては、試料を変性処理して得た一本鎖DNA(S-DNA)又は一本鎖RNA(S-RNA)を固相に結合させ、この固相にラジオアイソトープを標識したS-DNA又はS-RNAを作用させて固相のS-DNA又はS-RNAとハイブリッドを形成させてから未反応の標識S-DNA又はS-RNAを除去し、固相の放射線を測定する方法が行なわれていた。この方法は測定の際に固定化、洗浄等多くの工程を必要とし、特に試料の固定化に長時間を要するところから操作の労力及び時間の両方に問題があつた。

一方、最近DNAプローブを短かく切断してその5'端及び3'端にエネルギートランスファーする螢光物質を結合させ、ハイブリッドによりエネルギートランスファーを起こさせ、それによる螢光を測定してポリヌクレオチドを測定する技術が開発された(特開昭58-40099号公報)。しかしながら、この方法はDNAプローブを短かく切断するため特異性が低下し、また、螢光量が少ない

ために感度が充分でない等の問題があつた。

本発明者らはこのような問題のない方法を開発すべく種々検討の結果、予め標識された一本鎖ポリヌクレオチドを固相に結合させておき、この固相に試料を変性処理させて得た一本鎖ポリヌクレオチドを作用させてハイブリッドを形成させ、ハイブリッドしたポリヌクレオチドを制限酵素で切断する方法を案出し、その内容を既に特許出願(特願昭58-189702号)した。しかしながら、この方法もまだ固相の分離が必要であり、特に大量の検体を一度に処理する臨床分析等にあつてはこの分離操作が煩雑であつた。

【発明の構成】

本発明はこのような問題点を解決するものであり、測定対象の一本鎖ポリヌクレオチドとハイブリッドする一本鎖ポリヌクレオチドに2種の発光物質を結合させ、その間のエネルギー移動がこのポリヌクレオチドの切断によって変化することを利用している。

【問題点を解決するための手段】

本発明は、測定対象の一本鎖ポリヌクレオチドと二本鎖ポリヌクレオチドを形成しうる一本鎖ポリヌクレオチドに、発光物質1が直接又は間接的に結合し、かつ発光物質1によって励起されて発光する発光物質2が結合している標識ポリヌクレオチドに；測定対象の一本鎖ポリヌクレオチドを接触させて二本鎖ポリヌクレオチドを形成させ；該二本鎖ポリヌクレオチドに二本鎖ポリヌクレオチド制限酵素を作用させて該二本鎖ポリヌクレオチドを切断し、その後発光物質1又は発光物質2の発光を測定することを特徴とするポリヌクレオチドの測定方法に関するものである。

測定対象は一本鎖ポリヌクレオチド(以下、測定対象ポリヌクレオチドという。)である。測定対象ポリヌクレオチドにはDNA及びRNAを含む。試料中に含まれるポリヌクレオチドが二本鎖である場合には水酸化ナトリウム溶液の添加などのアルカリ処理あるいは熱処理などにより一本鎖にしておく必要がある。試料の種類は問わないが、例えば人血清、尿、組織抽出物などである。人血清などのようにポリヌクレオチドが蛋白と結合しているおそれがある場合には試料をプロテアーゼ等で処理して蛋白を分離しておくのがよい。

この測定対象ポリヌクレオチドと接触させる一

本鎖ポリヌクレオチド(以下、標識ポリヌクレオチドという。)は、発光物質1が直接又は間接的に結合し、かつ発光物質1によって励起されて発光する発光物質2が結合し、かつ該測定対象ポリヌクレオチドと二本鎖ポリヌクレオチドを形成しうるものである。従つて、この標識ポリヌクレオチドは測定対象ポリヌクレオチドに対するプローブである。この標識ポリヌクレオチドは測定対象ポリヌクレオチドを含む二本鎖ポリヌクレオチドをアルカリ処理、熱処理などで変性させて得てもよく、あるいは測定対象ポリヌクレオチド、DNase I 及びDNAポリメラーゼ I の存在下で各種ヌクレオチドを次々と結合させて得てもよい。

発光物質1は外部からの光を吸収して発光する発光物質又はリン光物質であつてもよく、酸化反応等の化学反応によって発光する化学発光物質あるいは生物発光物質であつてもよい。

発光物質2は発光物質1によって励起されて発光するものであり、従つて螢光物質又はリン光物質である。

発光物質1及び発光物質2に用いることができる螢光物質は通常320nm～600nm程度の波長で励起されて螢光を発するものである。このような螢光物質の例として、フルオレッセイン、ローダミン、ダンシルクロライド、フルオレスクアミン、クマリン、アクリジン、NADPH、NADH、ベンゾオキサジアゾール、トリアリールメタン、ビレン類、これらの誘導体あるいは活性化型のものなどを挙げることができる。

発光物質1に用いることができる化学発光物質の例としては、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウム、ヒドロペルオキシド、ポルフィリン、イントレン-3-イルヒドロペルオキシド、2, 4, 5-トリフォエニルイミダゾール及びこれらの誘導体を挙げることができる。生物発光物質の例としてはルシフェラーゼによって発光するルシフェリンを挙げることができる。

発光物質1に化学発光物質又は生物発光物質を用いる場合には、標識物質にはこれらの発光物質を直接又は間接的に発光させる物質を結合させることもできる。例えば、発光物質1にルシフェリンを用いる場合にはルシフェラーゼ又はその基質を結合させてこれらの作用によりルシフェリンを発光させることができる。

本発明の方法においては、発光物質1によって発光物質2が励起されるのであるから両者の組合せはこのような関係が成立するものが選択されなければならない。このような組合せの例としてフルオレッセインとローダミンを挙げができる。フルオレッセインは430~530nmの波長の光により励起され500~560nmの波長の螢光を発する。一方、ローダミンは530~580nmの波長の光により励起され560~620nmの波長の螢光を発する。従つて、この両者の混合物に430~530nmの光を照射すると500~560nmの螢光に加えて560~620nmの螢光も現われる。

発光物質1を直接又はビオチンアビシンを介して間接的に標識ポリヌクレオチドに結合させる方法、及び発光物質2を標識ポリヌクレオチドに結合させる方法は、公知の標識DNAの調製法によればよく、例えば、モノヌクレオチドに発光物質を導入して修飾型ヌクレオチドとし、これに未修飾のモノヌクレオチドを混合してニツクトランスレーション法あるいはポリヌクレオチドの化学的合成法等によってポリヌクレオチドにすればよい。そのほか、ニツクトランスレーション法や大腸菌を用いるcDNA作製法等によりポリヌクレオチドを作製し、一方発光物質を活性化しておいてその活性基をポリヌクレオチドと反応させてもよい。発光物質の結合方法としては、ポリヌクレオチドに直接結合させる方法のほか、ビオチンアビシンのビオチンをポリヌクレオチドに結合させ、アビシンを発光物質に結合させてこのビオチンアビシンの反応を利用して結合させるような間接的な方法をとつてもよい。

本発明の方法においては、発光物質1から発光物質2へエネルギートランスファーを起こせるところに特徴があり、このエネルギートランスファーを効率よく起こさせるためにポリヌクレオチドにおける発光物質1と発光物質2との間隔を50Å以下、従つて24~26塩基以内になるように両者を結合させることができが好ましい。

このような標識ポリヌクレオチドを測定対象ポリヌクレオチドと接触させて二本鎖ポリヌクレオチドを形成させる。接触時間は通常は測定対象ポリヌクレオチドが標識ポリヌクレオチドと充分に反応してハイブリッドを形成しうる程度であるが、例えば0.5~40時間程度が適当である。温度

は20~70°C程度、pHは5~9程度がよい。

二本鎖ポリヌクレオチドを形成させたのちはこれに二本鎖ポリヌクレオチド制限酵素（以下、単に制限酵素という。）を作用させる。この制限酵素は二本鎖ポリヌクレオチドにのみ特異的に作用するものがよく、また、認識ポリヌクレオチド鎖のあまり長くないもののほうが好ましい。制限酵素は1種のみでなく、2種以上を併用してもよい。制限酵素を作用させる時期は通常は測定対象ポリヌクレオチドと標識ポリヌクレオチドとの反応終了後であるが、測定対象ポリヌクレオチドと同時あるいはその前に反応系に添加しておいてもよい場合もある。

制限酵素を作用させたのちは発光物質1又は発光物質2の発光を測定する。測定は通常の螢光度計を用いてその強度を測定すればよい。

（作用）

標識ポリヌクレオチドは測定対象ポリヌクレオチドとハイブリッドを形成する。ハイブリッドを形成することによって制限酵素が働いてこの二本鎖ポリヌクレオチドを切断する。その結果、標識ポリヌクレオチドに結合されている発光物質1と発光物質2が分断されて別個に溶液中を動きまわるようになり、エネルギートランスファーが起こらなくなる。そこで、発光物質1の発光強度の減少はなくなり、一方、発光物質2からの発光はなくなる。

【発明の効果】

本発明の方法においては発光物質1から発光物質2へのエネルギートランスファーを利用しており、発光物質1の発光波長と発光物質2の発光波長が異なるところから両者の発光を別々に定量できる。その結果、先駆の方法と異なり固相と液相の分離及びそれに付随する洗浄操作が不要になる。

本発明の方法は従来の方法と異なり、測定対象ポリヌクレオチドを固相に固定するという煩雑な操作がなく、先駆の方法に比しても固液分離操作が不要な点でさらに簡便にされている。本発明の方法に用いる試薬、器具類はキット化が容易であり、このキットを使用することによってDNA等のポリヌクレオチドを実用的かつ簡便に測定することができる。

【実施例】

(1) HBV-DNAプローブの調製

500mlの慢性B型肝炎患者のプール血清を9000rpmで15分間遠心し、得られた上清を4°C 100000×gで5時間超遠心してB型肝炎ウイルス(HBV)をペレットとして集めた。このペレットを0.1MNaCl、1mM EDTA、0.1%2-メルカブトエタノール及び0.1%BSAを含む0.01Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)10mlに溶かし、このウイルス溶液のうち5mlを保存し、残5mlを100000×gで再度5時間超遠心してペレットを得た。

このペレットを0.5%NP-40を含む10mMトリス-塩酸、0.1MNaCl pH7.5溶液200μlで処理し、DNAポリメラーゼを活性化した。この溶液に1mM dATP、1mM dTTP、2.5μM³²PdGTP、2.5μM³²PdCTPを含む0.08M MgCl₂、0.2Mトリス緩衝液(pH7.5)50μlを加えて3時間加温した。この溶液を30%シュークロース溶液の入った遠心チューブに重層し、SW65ローター(ベックマン社製)を用い50000rpmで3時間遠心してペレットを得た。このペレットをプロナーゼで処理し、得られた溶液をエタノールで2回抽出処理した。抽出液を5~20%シュークロースグラジエントで50000rpmにて3時間遠心して15S³²PDNA分画を集めこれをプールした。この分画から15S³²PDNAをエタノールを用いて沈殿させ、乾燥して目的のHBV-DNAを得た。

(2) ニックトランスレーション法による修飾型HBV-DNAの調製

次に、5mMMgCl₂、10mM2-メルカブトエタノール、5μMdTTP、5μMdGTP、5μMdCTP、30 5μMdATP、10μMアミノヘキシルdATP及び10μMアミノヘキシルdCTPを含む50mMトリス-HCl緩衝液(pH7.5)100μlに(1)で得たHBV-DNA1μg、DNase I 100pg及びFDNAポリメラーゼ I 100pgを加えて15°Cで90分間インキュベートした。この溶液をエタノールで抽出し、SephadexG-50カラムで精製して修飾型HBV-DNAを得た。

この二本鎖HBV-DNA1μg(1ml)とHBV-DNAを導入した一本鎖M13-フアジDNA5μg(2ml)にホルムアミド8mlを加え、5分間この混合液を沸とうさせた。次に、これに2mlの緩衝液(0.07モル/1、トリス-HCl 2モル/1 NaCl、1.5mM EDTA pH7.5)を加え、50°Cで4

時間そしてさらに60°Cで1時間加温した。

この反応液をBio-GelA50mでゲル通過し、ハイブリッドしたDNAと未反応のDNAを分離した。ポアド分画の近くに溶出される最初のピーク5を分画し、これにNaClが0.1Mになるように粉末を加えて溶かした。そして、さらに100%エタノールを溶液1mlに対し2:1の比率(2ml)で加え、-70°Cで2時間放置した。次に、17000×gで10分間遠心し、エタノール沈殿物を50mlの10 0.1NNaOH、0.25mM EDTA、0.001%フェノールレッドで溶解した。ただちにこれをBio-GelA50でゲル通過し、目的の一本鎖HBV-DNAを得た。

(3) 発光物質の導入

15 ローダミンイソチオシアネート及びフレオレッセインイソチオシアネート各1.0μgを含むDMF溶液100μlにこの(2)で得た一本鎖HBV-DNA100μgを含む2mlの0.1M炭酸緩衝液pH10.0を混合し、4°Cで18時間反応させた。これをセフアデックスG-50でゲル通過し、フルオレッセイン及びローダミンを導入した一本鎖標識HBV-DNA100μgを得た。

(4) ヒト血清HBV-DNAの測定

20 HBウイルス性肝炎患者血清100μlに0.5NNaOH100μlを加えて室温で10分間攪拌した。次に、0.5NHCl100μlを加えさらに200μg/mlのプロテイナーゼK溶液200μlを加えて70°Cで1時間反応させた。(3)項で調製した発光物質フルオレッセイン及びローダミンが結合した一本鎖標識HBV-DNA10ngを含む溶液100μlを加えて37°Cで一夜放置した。これにd-DNA制限酵素溶液(Bgl II, Ava II, Hae II, Hae III, Hap II, Hinc II 各1U/ml、10mMトリス-HCl、7mMMgCl₂、70mMNaCl、7mM2-メルカブトエタノール、pH7.5)を1.0ml加えて37°Cで1時間反応させた。反応物に470nmの光を照射し、600nmの蛍光強度を測定した。

図面は得られた結果を示すものであり、縦軸は相対蛍光強度を示し、横軸は血清の希釈度を表わしている。

次に本発明法及び従来のラジオアイソトープを用いた方法で測定した各種ヒト血清のHBV-DNA量を示す。

本発明法

従来法

9

A	100pg
B	ND
C	210#
D	890#
E	60#

10

110pg	図面の簡単な説明
ND	図面は本発明法で測定した発光物質2の相対發光強度と血清希釈率との関係の一例を示すもので
200#	ある。
860#	
70#	5

